

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



11050 U.S. PTO
09/919932



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 09 690.9

Anmeldetag: 28. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotid-
sequenzen

Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 334.0

IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurke

Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metY-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen mindestens das metY-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metY-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 5 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- 10 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 15 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 20 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 25 ein Polynukleotid enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend die für das metY-Gen kodierende DNA-Sequenz von C.glutamicum, hinterlegt gemäß Budapester Vertrag in Corynebacterium glutamicum als pCREmetY am 13.05.00 unter DSM 13556

- 5 und coryneforme Bakterien, in denen das metY-Gen verstärkt vorliegt, insbesondere durch den Vektor pCREmetY.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
10 einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 15 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase kodieren, oder um solche
20 Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
25 Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase kodieren.

- Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
30 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge

von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 5 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
10 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus
15 hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid
20 gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80%, und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und
25 die genannte Aktivität aufweisen.

- Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren
30 produzieren, und in denen mindestens die für das metY-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
Corynebacterium glutamicum DSM5715.

- 5 oder daraus hergestellte L-Methionin produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

Das neue, für das Enzym O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase (EC
4.2.99.10) kodierende metY-Gen von C. glutamicum wurde
10 isoliert.

Zur Isolierung des metY-Gens oder auch anderer Gene von C.
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
15 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als
Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone,
Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie,
Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von
Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual
20 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine
sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes
W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in
λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and
General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine
25 Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des
Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of
the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.
coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids
Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

30 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHc79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer

- Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.
- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Die neue für das Gen metY kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metY-Genproduktes dargestellt.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in

Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991), 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die

Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- 5 Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride
10 sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,
15 Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von
20 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt
25 erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

- Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann
30 unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metY-Gens, gegebenenfalls in Kombination mit dem metA-Gen, in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, produzieren.

5 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
10 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin- und L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung
15 der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im
20 Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei
25 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei
30 Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24
35 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-

229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- 5 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metY-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al.,
10 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A
15 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

- 20 In den Abbildungen 1 und 2 sind Beispiele derartiger Plasmidvektoren dargestellt.

- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
25 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C.
30 glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of
35 Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993),

pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem metY-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann für die Herstellung von L-Lysin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 5 ◦ das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Methionin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 10 ◦ das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15 ◦ das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 20 ◦ das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- 25 ◦ das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden, wobei die zusätzliche Verstärkung von metA besonders bevorzugt wird.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metY Gens
5 eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 10 ◦ das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Methionin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metY Gens
15 eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 20 ◦ das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)
- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- 25 ◦ das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),
- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),

- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zu der Überexpression des metY-Gens, gegebenenfalls in Kombination mit dem metA-Ken, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 15 Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung schwefelhaltiger Aminosäuren, können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide, Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.
- 20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium
- 25 können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- 30 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu

einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.

- Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein
- 5 grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine,
- 10 Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.
- 15 Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).
- 20 Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 200 bis 2000 µm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet
- 25 „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile (< 5 %) an Korngrößen unter 20 µm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur
- 30 „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

- 5 Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen
- 10 Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

- Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren
- 15 („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen
- 20 insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

- Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße
- 25 Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

- 30 In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu

10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

- Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation
- 5 eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1
- 10 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel
- 15 Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.
- 20 Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt
- 25 werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist
- 30 gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-%.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- 5 f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 10 g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

Die Analyse von L-Lysin und L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al.

15 (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 13.05.00 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapestester Vertrag hinterlegt:

- 20 ° *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715/pCREmetY als DSM 13556

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
10 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
30 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La

Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

5 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
10 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metY-Gens

15 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
20 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
25 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
30 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der

Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1313 Basenpaaren, welches als metY-Gen bezeichnet wurde. Das metY-Gen kodiert für ein Protein von 437 Aminosäuren.

Beispiel 3

Konstruktion von Vektoren zur Expression von metY und metAY

3.1. Amplifikation der Gene metY und metA

Die Methioninbiosynthese-Gene metA und metY aus *C. glutamicum* wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischer Oligonukleotide amplifiziert. Ausgehend von den Nukleotidsequenzen der Methioninbiosynthese-Gene metY (SEQ ID No.1) und metA (Genbankeintrag Accession Number AF052652) von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße, in bp, ist in Klammern aufgelistet) sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Primer	Sequenz mit Restriktionsschnittstelle	Produkt	Plasmid
metY-EVP5	5'-CTAATAAGTCGACAAAGGAGGACA SalI ACCATGCCAAAGTACGAC- 3'	metY (1341 bp)	pCREmetY
metY-EVP3	5'-GAGTCTAATGCATGCTAGATTGCA NsiI GCAAAGCCG 3'		
metA-EVP5	5'-AGAACGAATTCAAAGGAGGACAAC EcoRI CATGCCCACCCTCGCGC-3'	metA (1161 bp)	pCREmetA
metA-EVP3	5'-GTCGTGGATCCCCTATTAGATGTA PstI GAACTCG-3'		

Die PCR-Experimente wurden mit der Taq DNA Polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland) in einem "PCT-100 Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden (Sek) bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sek bei einer Primer-abhängigen Temperatur von $T=(2 \times AT + 4 \times GC) - 5$ C (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D.D. Brown, and C.F. Fox (Eds.), Developmental Biology using Purified Genes. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 Sek dauernder Extensionsschritt bei 72°C. Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten (min) bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das 1341 bp große metY Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und NsiI gespalten, das 1161 bp große metA Fragment mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI. Beide Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmente metY (ca. 1330 bp) und metA (ca. 1150 bp) aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2. Klonierung von metY in den Vektor pZ8-1

Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der *E. coli* - *C. glutamicum* - Shuttle - Expressionsvektor pZ8-1 (EP 0 375 889) eingesetzt. DNA dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem Agarosegel isolierte metY-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten Vektor pZ8-1 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetY genannt. Es ist in Figur 1 dargestellt.

3.3. Klonierung von metA und metY in den Vektor pZ8-1

DNA des Plasmids pZ8-1 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem Agarosegel isolierte metA-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten Vektor pZ8-1 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetA genannt.

Das Plasmid pCREmetA wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Das in Beispiel 3.1 aus dem Agarosegel isolierte metY-Fragment wurde mit dem so vorbereiteten Vektor pCREmetA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt.

Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch
5 Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product
10 No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und durch Restriktionsspaltung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde pCREmetAY genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

15 Herstellung der Stämme DSM5715/pCREmetY und DSM5715/pCREmetAY

Die in Beispiel 3.2 und 3.3 genannten Vektoren pCREmetY und pCREmetAY wurden mit der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) in
20 Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A
25 Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid DNA wurde nach den üblichen Methoden aus jeweils einer Transformante isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144,
30 915-927) und durch Restriktionsspaltung mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Stämme wurden DSM5715/pCREmetY und DSM5715pCREmetAY genannt. Der Stamm DSM5715/pCREmetY wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig,

Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13556 hinterlegt.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin mit dem Stamm DSM5715/pCREmetY

- 5 Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pCREmetY wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- 10 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (50 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

15 Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

- 20 Diesem wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO_3	25 g/l

5 CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 .

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,

München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion
 5 bestimmt.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	10,6	15,7
DSM5715/pCREmetY	9,5	16,1

Beispiel 6

10 Herstellung von Methionin mit dem Stamm DSM5715/pCREmetAY

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pCREmetAY wurde in einem zur Produktion von Methionin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Methioningehalt im Kulturüberstand bestimmt.

15 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (50 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für
 20 die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII, wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet.

Diesem wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur
 25 angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur

0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet.

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 .

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Methioninmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 3

Stamm	OD(660)	Methionin-HCl mg/l
DSM5715	6,6	1,4
DSM5715/pCREmetAY	8,3	16,0

Folgende Abbildungen sind beigefügt:

- Abbildung 1: Plasmid pCREmetY
- Abbildung 2: Plasmid pCREmetAY

Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben
5 folgende Bedeutung:

	Kan:	Resistenzgen für Kanamycin
	metY:	metY-Gen von <i>C. glutamicum</i>
	metA:	metA-Gen von <i>C. glutamicum</i>
	Ptac:	tac-Promotor
10	rrnB-T1T2:	Terminator T1T2 des rrnB-Gens von <i>E. coli</i>
	rep:	Plasmidkodierter Replikationsursprung für <i>C. glutamicum</i> (von pHM1519)
	BamHI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Bam</i> HI
	EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Eco</i> RI
15	EcoRV:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Eco</i> RV
	PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Pst</i> I
	SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Sal</i> I
	XhoI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym <i>Xho</i> I

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das metY-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000053 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1720

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (200)..(1510)

<223> metY-Gen

25

<400> 1

catcctacac catttagagt ggggctagtc ataccccat aaccctagct gtacgcaatc 60

30

gatttcaaatt cagttggaaa aagtcaagaa aattaccgga gaataaattt ataccacaca 120

gtctattgca atagaccaag ctgttcagta ggggtgatgg gagaagaatt tcctaataaa 180

aactcttaag gacctccaa atg cca aag tac gac aat tcc aat gct gac cag 232

35

Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln
1 5 10

tgg ggc ttt gaa acc cgc tcc att cac gca ggc cag tca gta gac gca 280

Trp Gly Phe Glu Thr Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala
15 20 25

40

cag acc agc gca cga aac ctt ccg atc tac caa tcc acc gct ttc gtg 328

Gln Thr Ser Ala Arg Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val
30 35 40

45

ttc gac tcc gct gag cac gcc aag cag cgt ttc gca ctt gag gat cta 376

Phe Asp Ser Ala Glu His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu
45 50 55

50

ggc cct gtt tac tcc cgc ctc acc aac cca acc gtt gag gct ttg gaa 424

Gly Pro Val Tyr Ser Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu
60 65 70 75

55

aac cgc atc gct tcc ctc gaa ggt ggc gtc cac gct gta gcg ttc tcc 472

Asn Arg Ile Ala Ser Leu Glu Gly Gly Val His Ala Val Ala Phe Ser
80 85 90

	tcc gga cag gcc gca acc acc aac gcc att ttg aac ctg gca gga gcg	520
	Ser Gly Gln Ala Ala Thr Thr Asn Ala Ile Leu Asn Leu Ala Gly Ala	
	95 100 105	
5	ggc gac cac atc gtc acc tcc cca cgc ctc tac ggt ggc acc gag act	568
	Gly Asp His Ile Val Thr Ser Pro Arg Leu Tyr Gly Gly Thr Glu Thr	
	110 115 120	
10	cta ttc ctt atc act ctt aac cgc ctg ggt atc gat gtt tcc ttc gtg	616
	Leu Phe Leu Ile Thr Leu Asn Arg Leu Gly Ile Asp Val Ser Phe Val	
	125 130 135	
15	gaa aac ccc gac gac cct gag tcc tgg cag gca gcc gtt cag cca aac	664
	Glu Asn Pro Asp Asp Pro Glu Ser Trp Gln Ala Ala Val Gln Pro Asn	
	140 145 150 155	
20	acc aaa gca ttc ttc ggc gag act ttc gcc aac cca cag gca gac gtc	712
	Thr Lys Ala Phe Phe Gly Glu Thr Phe Ala Asn Pro Gln Ala Asp Val	
	160 165 170	
25	ctg gat att cct gcg gtg gct gaa gtt gcg cac cgc aac agc gtt cca	760
	Leu Asp Ile Pro Ala Val Ala Glu Val Ala His Arg Asn Ser Val Pro	
	175 180 185	
30	ctg atc atc gac aac acc atc gct acc gca gcg ctc gtg cgc ccg ctc	808
	Leu Ile Ile Asp Asn Thr Ile Ala Thr Ala Ala Leu Val Arg Pro Leu	
	190 195 200	
35	gag ctc ggc gca gac gtt gtc gtc gct tcc ctc acc aag ttc tac acc	856
	Glu Leu Gly Ala Asp Val Val Ala Ser Leu Thr Lys Phe Tyr Thr	
	205 210 215	
40	ggc aac ggc tcc gga ctg ggc ggc gtg ctt atc gac ggc gga aag ttc	904
	Gly Asn Gly Ser Gly Leu Gly Gly Val Leu Ile Asp Gly Gly Lys Phe	
	220 225 230 235	
45	gat tgg act gtc gaa aag gat gga aag cca gta ttc ccc tac ttc gtc	952
	Asp Trp Thr Val Glu Lys Asp Gly Lys Pro Val Phe Pro Tyr Phe Val	
	240 245 250	
50	act cca gat gct gct tac cac gga ttg aag tac gca gac ctt ggt gca	1000
	Thr Pro Asp Ala Ala Tyr His Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gly Ala	
	255 260 265	
55	cca gcc ttc ggc ctc aag gtt cgc gtt ggc ctt cta cgc gac acc ggc	1048
	Pro Ala Phe Gly Leu Lys Val Arg Val Gly Leu Leu Arg Asp Thr Gly	
	270 275 280	
60	tcc acc ctc tcc gca ttc aac gca tgg gct gca gtc cag ggc atc gac	1096
	Ser Thr Leu Ser Ala Phe Asn Ala Trp Ala Ala Val Gln Gly Ile Asp	
	285 290 295	
65	acc ctt tcc ctg cgc ctg gag cgc cac aac gaa aac gcc atc aag gtt	1144
	Thr Leu Ser Leu Arg Leu Glu Arg His Asn Glu Asn Ala Ile Lys Val	
	300 305 310 315	
70	gca gaa ttc ctc aac aac cac gag aag gtg gaa aag gtt aac ttc gca	1192
	Ala Glu Phe Leu Asn Asn His Glu Lys Val Glu Lys Val Asn Phe Ala	
	320 325 330	

ggc ctg aag gat tcc cct tgg tac gca acc aag gaa aag ctt ggc ctg 1240
 Gly Leu Lys Asp Ser Pro Trp Tyr Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gly Leu
 335 340 345

5 aag tac acc ggc tcc gtt ctc acc ttc gag atc aag ggc ggc aag gat 1288
 Lys Tyr Thr Gly Ser Val Leu Thr Phe Glu Ile Lys Gly Gly Lys Asp
 350 355 360

10 gag gct tgg gca ttt atc gac gcc ctg aag cta cac tcc aac ctt gca 1336
 Glu Ala Trp Ala Phe Ile Asp Ala Leu Lys Leu His Ser Asn Leu Ala
 365 370 375

15 aac atc ggc gat gtt cgc tcc ctc gtt gtt cac cca gca acc acc acc 1384
 Asn Ile Gly Asp Val Arg Ser Leu Val Val His Pro Ala Thr Thr Thr
 380 385 390 395

20 cat tca cag tcc gac gaa gct ggc ctg gca cgc gcg ggc gtt acc cag 1432
 His Ser Gln Ser Asp Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln
 400 405 410

tcc acc gtc cgc ctg tcc gtt ggc atc gag acc att gat gat atc atc 1480
 Ser Thr Val Arg Leu Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile
 415 420 425

25 gct gac ctc gaa ggc ggc ttt gct gca atc tagctttaaa tagactcacc 1530
 Ala Asp Leu Glu Gly Gly Phe Ala Ala Ile
 430 435

30 ccagtgcctta aagcgctggg tttttctttt tcagactcgt gagaatgcaa actagactag 1590
 acagagctgt ccatatacac tggacgaagt tttagtcttg tccaccacaga acaggcgggt 1650
 attttcatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat cggtgatgtc 1710

35 tccaccgaag 1720

40 <210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

45 <400> 2
 Met Pro Lys Tyr Asp Asn Ser Asn Ala Asp Gln Trp Gly Phe Glu Thr
 1 5 10 15

50 Arg Ser Ile His Ala Gly Gln Ser Val Asp Ala Gln Thr Ser Ala Arg
 20 25 30

Asn Leu Pro Ile Tyr Gln Ser Thr Ala Phe Val Phe Asp Ser Ala Glu
 35 40 45

55 His Ala Lys Gln Arg Phe Ala Leu Glu Asp Leu Gly Pro Val Tyr Ser
 50 55 60

Arg Leu Thr Asn Pro Thr Val Glu Ala Leu Glu Asn Arg Ile Ala Ser
 65 70 75 80

	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	His	Ala	Val	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala	
					85					90					95		
5	Thr	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	His	Ile	Val	
				100					105					110			
	Thr	Ser	Pro	Arg	Leu	Tyr	Gly	Gly	Thr	Glu	Thr	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr	
			115					120					125				
10	Leu	Asn	Arg	Leu	Gly	Ile	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Asp	
		130					135					140					
	Pro	Glu	Ser	Trp	Gln	Ala	Ala	Val	Gln	Pro	Asn	Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	
15		145				150					155					160	
	Gly	Glu	Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Asp	Val	Leu	Asp	Ile	Pro	Ala	
				165						170					175		
20	Val	Ala	Glu	Val	Ala	His	Arg	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Ile	Asp	Asn	
				180					185					190			
	Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	
			195					200					205				
25	Val	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Lys	Phe	Tyr	Thr	Gly	Asn	Gly	Ser	Gly	
		210					215					220					
	Leu	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Gly	Lys	Phe	Asp	Trp	Thr	Val	Glu	
30		225				230					235					240	
	Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Tyr	Phe	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Ala	
					245					250					255		
35	Tyr	His	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala	Phe	Gly	Leu	
				260					265					270			
	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	
			275					280					285				
40	Phe	Asn	Ala	Trp	Ala	Ala	Val	Gln	Gly	Ile	Asp	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	
		290					295					300					
	Leu	Glu	Arg	His	Asn	Glu	Asn	Ala	Ile	Lys	Val	Ala	Glu	Phe	Leu	Asn	
45		305				310					315					320	
	Asn	His	Glu	Lys	Val	Glu	Lys	Val	Asn	Phe	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Ser	
					325					330					335		
50	Pro	Trp	Tyr	Ala	Thr	Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Tyr	Thr	Gly	Ser	
				340					345					350			
	Val	Leu	Thr	Phe	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Lys	Asp	Glu	Ala	Trp	Ala	Phe	
			355					360					365				
55	Ile	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	His	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	
		370					375					380					
	Arg	Ser	Leu	Val	Val	His	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	His	Ser	Gln	Ser	Asp	
						390					395					400	

Glu Ala Gly Leu Ala Arg Ala Gly Val Thr Gln Ser Thr Val Arg Leu
405 410 415

5 Ser Val Gly Ile Glu Thr Ile Asp Asp Ile Ile Ala Asp Leu Glu Gly
420 425 430

Gly Phe Ala Ala Ile
435

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das metY-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch
ist mit einem Polynukleotid, das für ein
Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert,
das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu
mindestens 70% identisch ist mit der
Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-
20 Acetylhomoserin-Sulphydylase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das
Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das
25 Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2 oder 3, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 oder 3, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
30 oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung der Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2 oder 3, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metY-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
- b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolieren von der L-Aminosäure.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die L-Methionin produzierenden

- coryneformen Bakterien, in denen man das Gen metY gegebenenfalls mit met A verstärkt, insbesondere überexprimiert;
- 5 b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- 10 c) Isolieren von der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
- 15 11. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten Aminosäure verringern.
- 20 12. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor das metY-Gen und gegebenenfalls zusätzlich das metA-Gen trägt.
- 25 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für die Gene metA und metY kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 30 14. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 14.1 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 14.2 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 14.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk
- 5 14.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc
- 14.5 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
15 aus der Gruppe
- 15.1 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 20 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 15.4 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA,
- 15.5 das für die Cystahionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB,
25
- 15.6 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD,
- 15.7 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA

15.8 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk

15.9 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc

5 verstärkt, insbesondere überexprimiert.

10 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, welche eine
zusätzliche Verstärkung des metY Gens durch metA
aufweisen.

15 17. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, welche eine
zusätzliche Verstärkung des metY Gens durch
Abschwächung, insbesondere Verringerung der Expression
eines oder mehrerer Gene ausgewählt aus der Gruppe

20 17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck

17.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi

17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB.

25 18. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe

30 18.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen
thrB

- 18.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen
ilvA
- 18.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 18.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase
5 kodierende Gen ddh
- 18.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck
- 18.6 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi
- 10 18.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
abschwächt bzw. die Expression verringert.
19. Coryneforme Bakterien, in denen das metY-Gen
verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
- 15 20. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
21. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man
Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum
einsetzt.
- 20 22. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen
Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen,
gekennzeichnet durch die Schritte
- 25 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin
produzierenden Mikroorganismus in einem
Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin
haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);

- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- 5 d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.
- 10 23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-Methionin verstärkt.
- 15 24. Verfahren gemäß Anspruch 23, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-Methionin verringern.
- 20 25. Verfahren gemäß Anspruch 23, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression der Polynukleotide, die für das metY-Gen kodieren verstärkt, insbesondere überexprimiert.
26. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 22-25, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 25 27. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender Schritte durchführt:
- 30 e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d) erhaltenen Produkten;

- 5 f) Zugabe von Hilfsstoffen zu den nach b) bis e) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.
- 10 28. Verfahren gemäß Anspruch 22 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt wird.
29. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
- 15 30. Verfahren gemäß Anspruch 22 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu 5 Gew.-% liegt.
31. Verfahren gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
- 20 32. Verfahren gemäß Anspruch 27, 28, 29, 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
- 25 33. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen 22 bis 32.
- 30 34. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-% L-Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs, enthält.

35. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des metY-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.
- 10 36. Corynebacterium glutamicum Stamm DM5715/pCREmetY hinterlegt bei der DSMZ, Braunschweig, unter der Nr. DSM 12840.

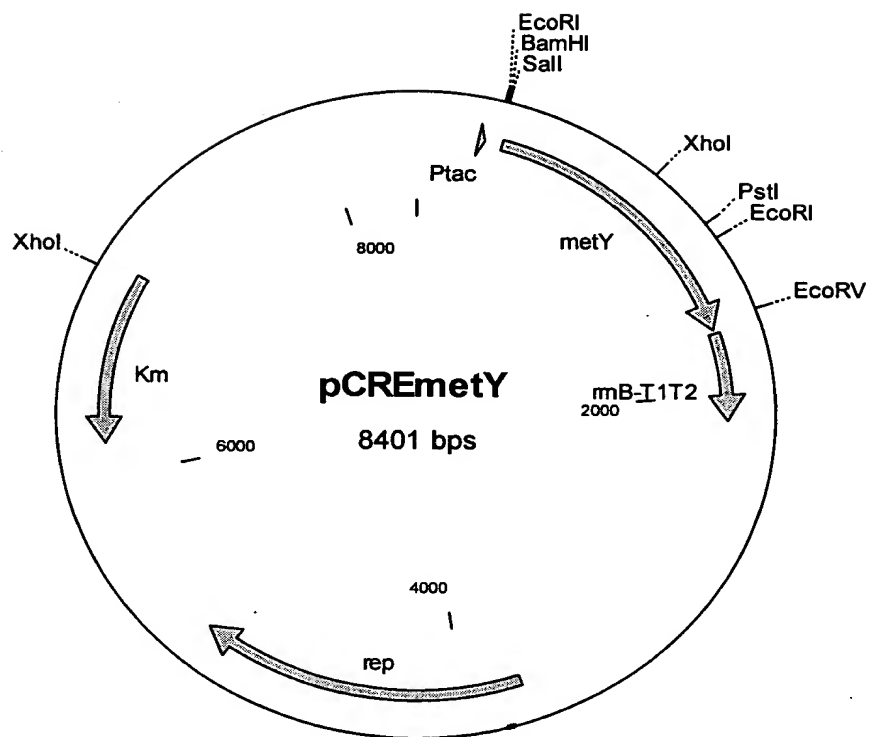
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metY-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung der Polynukleotide, die die erfindungsgemäßen polynukleotidsequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmid pCREmetY



Figur 2: Plasmid pCREmetAY

